

不同方法提取侧柏叶中挥发性成分的气相色谱-质谱分析

回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 李学成, 耿红苓

(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114005)

摘要:采用气相色谱-质谱法(GC/MS)分析酶提取法(CE)、同时蒸馏萃取法(SDE)和水蒸气蒸馏-萃取法(DSE)三种方法提取侧柏叶挥发性成分。结果表明:三种方法提取侧柏叶挥发油的化学成分均有差异。酶提取法提取侧柏叶挥发油鉴定出 32 种化合物, 主要成分为雪松烯, 占挥发油总量的 41.25%; 同时蒸馏-萃取法提取侧柏叶挥发油鉴定出 29 种化合物, 主要成分为雪松醇, 占挥发油总量的 39.06%; 水蒸气蒸馏-萃取法提取侧柏叶挥发油鉴定出 32 种化合物, 主要成分为雪松醇, 占挥发油总量的 31.43%。

关键词:侧柏叶; 挥发油; 酶提取; 同时蒸馏萃取; 气相色谱-质谱

中图分类号:O657.63; Q949.667 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2006)04-226-06

**Analysis of Volatile Components from Leaf Twigs
in *Biota Orientalis* with Different Extraction Methods
by Gas Chromatography-Mass Spectrometry**

HUI Rui-hua, HOU Dong-yan, LIU Xiao-yuan, LI Xue-cheng, GENG Hong-ling

(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005, China)

Abstract: Volatile oils were extracted from leaf twigs in *Biota orientalis* by cellulase extraction (CE) method, simultaneous distillation extraction (SDE) method and stream distillation-extraction method (DSE), the components were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The results indicated that the compounds from the volatile oils extracted by the three methods were different. Thirty-two chemical components were identified by CE, the major component of them was cedrene accounting for 41.25% of total volatile components; twenty-nine chemical components were identified by SDE, the major component was cedrol accounting for 39.06%; thirty-two chemical components were identified by DSE, the major component was cedrol accounting for 31.43%, respectively.

Key words: leaf twigs in *Biota orientalis*; volatile oil; cellulase extraction; simultaneous distillation extraction; gas chromatography-mass spectrometry

侧柏叶为柏科(*Cupressaceae*)植物侧柏 *Biota orientalis* (L.) Endl. 的干燥嫩枝叶, 侧柏别

名扁柏、香柏、片柏、片松。常绿乔木, 多为栽培, 为我国特产^[1]。侧柏叶气清香, 味苦涩、微辛。

具有凉血止血、清肺止咳功效,在临床上常用于治疗出血症、风湿痹痛、高血压、咳喘等,国内外学者对其临床、药理作用及化学成分进行过研究^[2-3]。但有关侧柏叶的挥发性成分的研究报道尚不多见。由于侧柏叶挥发性化学组分比较复杂,且随提取方法不同在很大程度上会发生变化。本文采用酶提取技术、同时蒸馏萃取和水蒸气蒸馏-萃取的方法对侧柏叶进行挥发油的提取,并对这三种方法提取的挥发性成分进行对比。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP 6890-5973 型气相色谱-质谱联用仪;SDE 装置(自制);R2-201 型旋转蒸发器(上海中科机械研究所);无水硫酸钠、亚硫酸氢钠等(分析纯)。

侧柏叶:2002 年秋季 9 月采自中国千山,经辽宁大学环境与生命科学技术学院鉴定为 *Bio-ta orientalis* (L.) Endl. 的枝叶,阴干粉碎(过孔径为 0.3 mm 筛)备用。纤维素酶:由辽宁大学环境与生命科学技术学院提供。纤维素酶活力测定:采用文献^[4]方法。

1.2 酶提取法

取 50 g 干燥的侧柏叶粉末置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 去离子水,调节 pH 值为 4.5,加入 1.0 g 纤维素酶,在 40 ℃ 下振荡均匀并保持 10 min,使酶解完全。将烧瓶接至 SDE 装置的一端,控制温度 100~110 ℃ 之间保持沸腾。另取 100 mL 重蒸乙醚置于 500 mL 单颈圆底烧瓶中,接在 SDE 装置的另一端,以恒温水浴加热烧瓶,在 40 ℃ 下连续萃取 5 h。侧柏叶挥发油的乙醚萃取液用无水硫酸钠脱水,用旋转蒸发器除去乙醚,得到黄色透明液体,收率为 $w=6.0\%$ 。密封保存于一 10 ℃ 冰箱中备用。

1.3 同时蒸馏-萃取法^[5]

取 50 g 干燥的侧柏叶粉末置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 去离子水,振荡均匀后接至 SDE 装置的一端,控制温度 100~110 ℃ 之间保持沸腾。另取 100 mL 重蒸乙醚置于 500 mL 单颈圆底烧瓶中,接在 SDE 装置的另一端,以恒温水浴加热烧瓶,在 40 ℃ 下连续萃取 5 h。侧柏叶挥发油的乙醚萃取液用无水硫酸钠脱水,用旋转蒸发器除去乙醚,得到黄色透明液体,收

率为 $w=3.0\%$ 。密封保存于一 10 ℃ 冰箱中备用。

1.4 水蒸气蒸馏-萃取法

取 50 g 干燥的侧柏叶粉末置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 去离子水,用水蒸气蒸馏 5 h,馏出液用乙醚连续萃取三次,用活化过的无水硫酸钠脱水,侧柏叶挥发性化学成分的乙醚萃取液用旋转蒸发器除去乙醚,得到黄色透明液体,收率为 $w=4.0\%$ 。

1.5 气相色谱-质谱测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱:HP-5 弹性石英毛细管柱 25 m×0.25 mm×0.33 μm;升温程序:初始温度 60 ℃,以 5 ℃/min 升至 200 ℃;汽化温度 230 ℃;进样量:0.2 μL;溶剂延迟:3 min;载气(He)流量:2 mL/min;分流比为 20:1。

1.5.2 质谱条件 离子源:电子轰击(EI);离子源温度:200 ℃;电子能量:70 eV;发射电流:34.6 μA;电子倍增器电压:1 200 V;接口温度 230 ℃;质量范围: m/z 20~500。

1.6 测定方法

分别取酶提取法、同时蒸馏-萃取法和水蒸气蒸馏-萃取法提取的侧柏叶挥发油样品各 0.2 μL,用气相色谱-质谱联用仪进行分析鉴定。通过 G170LBA 化学工作站数据处理系统,检索 NIST98 谱图库,并分别与八峰索引及 EPA/NIH 质谱图集的标准谱图进行对照,复合,再结合有关文献进行人工谱图解析^[6-7],确认其挥发油的各个化学成分,再通过 G170LBA 化学工作站数据处理系统,按面积归一化法进行定量分析,分别求得各化学成分在挥发油中的相对百分含量。

2 结果与讨论

2.1 测定结果

2.1.1 挥发油的总离子流图 按 1.6 测定方法进行实验,三种方法提取侧柏叶挥发油的总离子流图如图 1、2、3 所示。

2.1.2 化学成分鉴定结果 三种方法提取侧柏叶挥发油中的化学成分及求得的各化学成分在挥发油中的相对百分含量结果见表 1。

2.2 结果讨论

由 1.2、1.3、1.4 可知酶提取法提取侧柏叶挥发油收率为 $w=6.0\%$,同时蒸馏-萃取法为 $w=3.0\%$,水蒸气蒸馏-萃取法为 $w=4.0\%$ 。

由表 1 可知酶提取法提取侧柏叶挥发油,鉴定出 32 种化合物,占挥发油总量的 98.73%,其主要成分为雪松烯,占挥发油总量的 41.25%;同时蒸馏-萃取法提取侧柏叶挥发油,鉴定出 29 种化合物,占挥发油总量的 97.14%,其主要成分为雪松醇,占挥发油总量的 39.06%;水蒸气蒸馏-萃取法提取侧柏叶挥发油,鉴定出 32 种化合物,占挥发油总量的 98.67%,其主要成分为雪松醇,占挥发油总量的 31.43%。

由于侧柏叶的植物细胞由细胞壁及原生质体组成,细胞壁的主要成分是纤维素,细胞间存

在的细胞间质将细胞网络其中,在提取过程中,当细胞原生质体中的挥发性成分向提取介质扩散时,必须克服细胞壁及细胞间质的双重阻力。酶提取侧柏叶挥发性化学成分的过程中,由于纤维素酶作用于侧柏叶的植物细胞,使细胞壁及细胞间质中的纤维素降解,引起细胞壁及细胞间质结构产生局部疏松、膨胀、崩溃等变化,减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对挥发性成分从细胞内向提取介质扩散的传质阻力,从而提高挥发性化学成分的提取率^[8]。

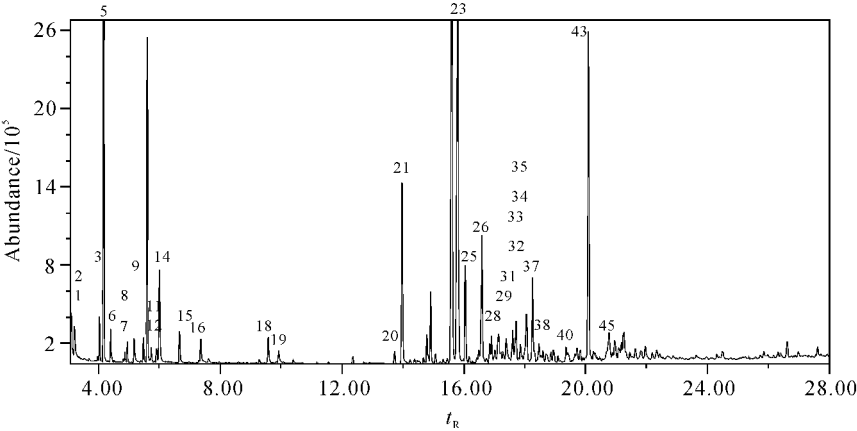


图 1 酶提取侧柏叶挥发油总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of volatile oil by DE method

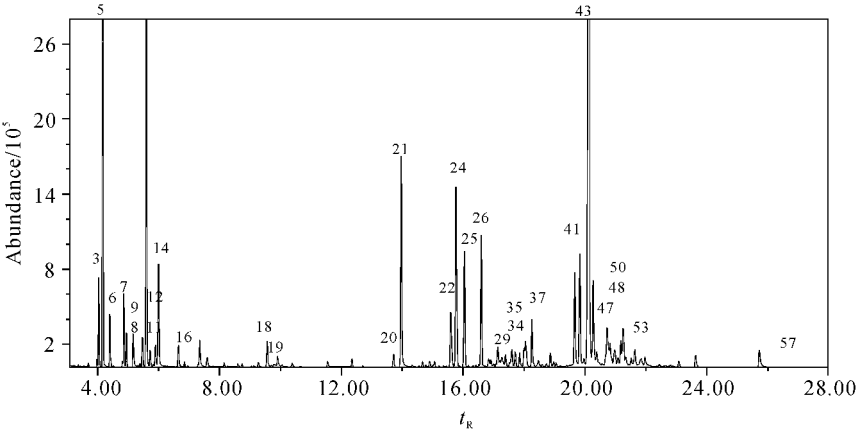


图 2 同时蒸馏提取侧柏叶挥发油总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of volatile oil by SDE method

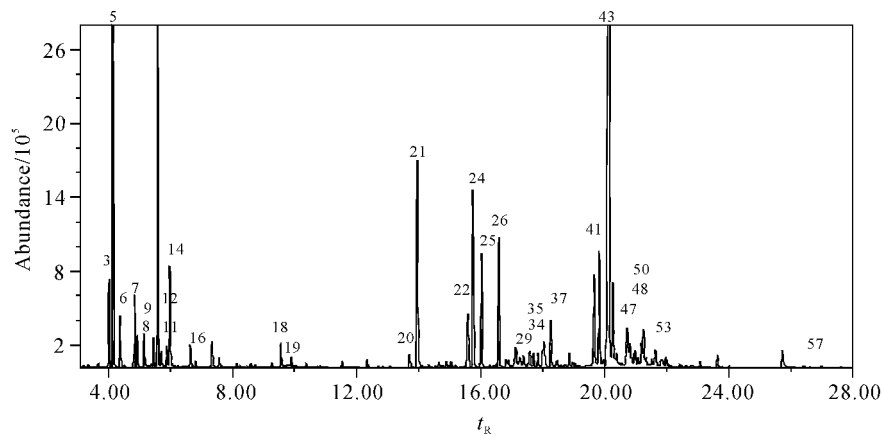


图 3 水蒸气蒸馏-萃取侧柏叶挥发油总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of volatile oil by DSE method

表 1 侧柏叶挥发油中化学成分鉴定结果

Table 1 Identified components of volatile oil from leaf twigs in <i>Biota orientalis</i>							
序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	化合物 Compound	相对含量 Relative content/%			分子式 Formula	相似度 Similarity /%
			CE	SDE	DSE		
1	3.12	乙基苯 ethylbenzene	0.38			C ₈ H ₁₀	91
2	3.22	对二甲苯基 p-xylene	0.61			C ₈ H ₁₀	94
3	4.04	2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己-2-烯 2-methyl-5-(1-methylethyl) bicyclo[3.1.0]-hex-2-ene	0.66	1.34	0.24	C ₁₀ H ₁₆	91
4	4.16	2,6,6-三甲基-双环[3.1.1]庚-2-烯 2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]-hept-2-ene			3.37	C ₁₀ H ₁₆	95
5	4.17	α-蒎烯 α-Pinene	16.20	23.71		C ₁₀ H ₁₆	95
6	4.40	7,7-二甲基-2-亚甲基,双环[2.2.1]庚烷 7,7-dimethyl-2-methylene bicyclo[2.2.1]-heptane	0.58	0.90		C ₁₀ H ₁₆	98
7	4.95	β-蒎烯 β-pinene	0.34	0.58		C ₁₀ H ₁₆	95
8	5.18	β-水芹烯 β-phellandrene	0.53	1.19		C ₁₀ H ₁₆	82
9	5.48	α-水芹烯 α-phellandrene	0.46	0.52		C ₁₀ H ₁₆	91
10	5.59	3-蒎烯 3-carene			2.59	C ₁₀ H ₁₆	95
11	5.74	4-蒎烯 4-carene	0.29	0.29		C ₁₀ H ₁₆	95
12	5.91	1-甲基-4-(1-甲基乙基)苯 1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene	0.31	0.44	0.63	C ₁₀ H ₁₆	87
13	6.00	β-水芹烯 β-phellandrene			0.86	C ₁₀ H ₁₆	91
14	6.01	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己-2-烯 4-methyl-1-(1-methylethyl)-bicyclo[3.1.0]-hex-2-ene	2.20	2.26		C ₁₀ H ₁₄	91
15	6.67	3-蒎烯 3-carene	0.70		2.59	C ₁₀ H ₁₆	94
16	7.36	1-甲基-4-(1-甲基亚乙烯基)环己烯 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene	0.58	0.46		C ₁₀ H ₁₆	96
17	9.28	冰片 borneol			0.52	C ₁₀ H ₁₈ O	93
18	9.58	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexene-1-ol	0.65	0.62	0.63	C ₁₀ H ₁₈ O	98

续表							
序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	化合物 Compound	相对含量			分子式 Formula	相似度 Similarity/%
			Relative content/%				
			CE	SDE	DSE		
19	9.92	$\alpha,\alpha,4$ -三甲基-3-环己烯-1-甲醇 $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-3-cyclohex-ene-1methanol	0.33	0.60		C ₁₀ H ₁₈ O	82
20	13.73	1,7,7-三甲基-三环[2.2.1.6]庚烷 1,7,7-trimethyl-tricyclo[2.2.1.6]-heptane	0.32	0.32	0.35	C ₁₀ H ₁₆	87
21	13.98	3,7,7-三甲基-双环[4.1.0]庚-2-烯 3,7,7-trimethyl-bicyclo[4.1.0]-hept-2-ene	4.35	5.05	5.31	C ₁₅ H ₂₄	87
22	15.60	可巴烯 copaene		1.60	1.63	C ₁₅ H ₂₄	93
23	15.61	α -雪松烯 α -cedrene	41.25			C ₁₅ H ₂₄	99
24	15.77	石竹烯 caryophyllene		4.94	5.12	C ₁₅ H ₂₄	99
25	16.05	罗汉柏烯 thujopsene	2.35	2.77	2.93	C ₁₅ H ₂₄	99
26	16.60	1,1,4,8-四甲基-4,7,10-环十一三烯 1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10-cycloundecatriene	3.44	3.10		C ₁₅ H ₂₄	99
27	16.61	α -石竹烯 α -caryophyllene			3.58	C ₁₅ H ₂₄	98
28	16.86	2,6-二甲基-3-戊烯基-双环[3.1.1]庚-2-烯 2,6-dimethyl-3-pentenyl-bicyclo[3.1.1]-hept-2-ene	0.43			C ₁₅ H ₂₄	93
29	17.14	7-甲基-4-亚甲基-1(1-甲基乙基)萘 7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-naphthalene	1.10	0.55	0.90	C ₁₅ H ₂₄	97
30	17.28	7-甲基-3-亚甲基-4-(1-甲基乙基)-1H-环戊[1.3]环丙[1.2]苯 7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-1H-cyclopenta[1.3]-cyclopropa[1.2]-benzene			0.57	C ₁₅ H ₂₄	95
31	17.40	4,11-按叶油烯 4,11-eudesma-diene	0.86			C ₁₅ H ₂₄	97
32	17.60	1,1,3-三甲基-7-亚甲基-环丙萘 1,1,3-trimeththyl-7-methyl-ene-cyclopropa-maputhalene	0.64			C ₁₅ H ₂₄	98
33	17.61	1,2,3,4,4,5,6,8-八氢化-4,8-二甲基-2-(1-甲基乙基)萘 1,2,3,4,4,5,6,8-octahydro-4,8-dimethyl-2-(1-methylethyl)-naphthalene	0.89		0.64	C ₁₅ H ₂₄	96
34	17.72	1,2,4,5,6,8-六氢化-4,7-二甲基萘 1,2,4,5,6,8-hexa-hydro-4,7-dimethyl-naphthanlene	1.36	0.34	0.90	C ₁₅ H ₂₄	93
35	17.86	1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)苯 1-methyl-4-(1,2,2-trim-ethylcyclopentyl)-benzene	0.63	0.35		C ₁₅ H ₂₄	98
36	18.04	2,6-二叔丁基对甲酚 butylated hydroxytoluene			17.46	C ₁₅ H ₂₄ O	95
37	18.26	1,2,3,5,6,8 六氢化-4,7-二甲基-1-甲基乙基萘 1,2,3,5,6,8-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(methylethyl)-naphthalene	2.30	1.96	1.70	C ₁₅ H ₂₄	95
38	18.48	1,6-二甲基-4(1-甲基乙基)萘 1,6-dimethyl-4-(1-methyleth-yl)-naphthalene	0.35			C ₁₅ H ₂₄	95
39	18.88	4-乙烯基-2,2,4-三甲基-3-(1-甲基乙基)环戊烷甲醇 4-ethe-nyl-2,2,4-trimethyl-3-(1-methylethyl)-cyclohexanemethanol			0.37	C ₁₂ H ₂₆ O	92
40	19.36	螺[4.5]-6-癸酮 spiro[4.5]-6-decanone	0.28			C ₁₀ H ₁₆ O	83
41	19.67	氧化石竹烯 caryophyllene oxide		4.19	3.22	C ₁₅ H ₂₄ O	95
42	19.85	N-乙基-N,N-二甲基对苯二胺 N-ethyl-N,N-dimethyl-p-phe-nylenediaminem			3.23	C ₁₀ H ₁₆ N ₂	85
43	20.10	雪松醇 cedrol	8.68	39.06	31.43	C ₁₂ H ₂₆ O	98

续表							
序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	化合物 Compound	相对含量			分子式 Formula	相似度 Similarity/%
			Relative content/%				
			CE	SDE	DSE		
44	20.30	十氢化萘 decahydro naphthalene			2.93	C ₁₀ H ₁₈	86
45	20.77	1,1,3,7-甲基-环丙基萘 1,1,3,7-tetramethyl-cyclopropanaphthalene	1.40			C ₁₅ H ₂₄	96
46	20.84	2,3,4,7,8,8a-六氢化-3,6,8,8-四甲基-7-桥亚甲基甘菊环 2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8-tetramethyl-7-methanoazulene			2.79	C ₁₅ H ₂₄	86
47	20.96	2-异丙基-5-甲基-9-亚甲基-双环[4.4.0]癸-1-烯 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-bicyclo[4.4.0]-dec-1-ene		0.76		C ₁₅ H ₂₄	93
48	21.19	三甲基-8-亚甲基-2-萘甲醇 trimethyl-8-methylene-2-naphthalenemethanol		0.47		C ₁₅ H ₂₆ O	94
49	21.20	十氢化-1,1,7-三甲基-4-亚甲基-1H-环丙-甘菊环 decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-1H-cyclopro-azulene			0.64	C ₁₅ H ₂₆ O	87
50	21.26	4-甲基-1-亚甲基-7-甲基亚乙烯基-萘 4-methyl-1-methylene-7-methylethylidene-naphthalene		1.17		C ₁₅ H ₂₄	85
51	21.27	1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢化- α , α , 4a-8-四甲基-2-萘甲醇 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- α , α ,4a-8-tetramethyl-2-naphthaenemethanol			1.29	C ₁₅ H ₂₆ O	94
52	21.65	1-亚甲基-2-羟基甲基-3,3-二甲基-4 a-(3-甲基丁-2-烯基)环己烷 1-methylidene-2-hydroxymethyl-3,3-dimethyl-4a-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexane			0.63	C ₁₅ H ₂₆ O	86
53	21.97	8-羟基-4-亚异丙基-7-甲基-双环[5.3.1]十一碳烯 8-hydroxy-4-isopropylidene-7-methyl,bicyclo[5.3.1]-undec-1-ene		0.44		C ₁₅ H ₂₄ O	84
54	23.09	7-乙酰基-2-羟基-2-甲基-5-异丙基双环[4.3.0]壬烷 7-acetyl-2-hydroxy-2-methyl-5-isopropylbicyclo[4.3.0]-nonane			0.41	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	87
55	23.64	八氢化-3,8,8-三甲基-6-亚甲基-3a,7 桥亚甲基甘菊环 octahydro-3,8,8-trimethyl-6-methylene-3a,7-methanoazulene			0.56	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	93
56	25.73	1,2-苯二甲酸,丁基-8-甲基壬基酯 1,2-benzenedicarboxylic acid,buty-8-methyl-memyl ester			1.87	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	88
57	26.62	1,1,4-三甲基-6-亚甲基-5-(3-甲基-2,4 戊二烯基)萘 1,1,4-trimethyl-6-methylene-5-(3-methyl-2,4-pentadienyl)-naphthalene	0.44			C ₂₀ H ₃₂	95

参考文献:

[1] 卫 金. 侧柏造林研究初报[J]. 山西林业科技, 2001(12): 11-16.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社. 1985:1 472-1 473.

[3] 阎焕兰,邴雅掭. 鲜侧柏叶治疗大面积皮下出血临床体会[J]. 兰州医学院学报,2002,28(2): 98.

[4] 刘妙莲,王 洁. 影响纤维素酶活力测定的几个因素[J]. 食品与发酵工业, 2000,26(6): 37-39.

[5] 回瑞华,侯冬岩,李铁纯. 黄柏挥发性化学成分分析[J]. 分析化学,2001,29(3):361-364.

[6] Heller S R, Milne G W A. EPA / NIH Mass Spectral Dtabase. Washington: US Government Printing Office, 1978,1-4.

[7] 施钧慧,汪聪慧. 香料质谱图集[M]. 北京:中国质谱学会,1992:220-229.

[8] 魏 刚,王淑英. 侧柏叶挥发油化学成分气质联用分析[J]. 时珍国医国药, 2001,12(1):18-19.